

Zur Frage der Bildung
von Phenyläthylacetylharnstoff
aus Luminal

von

OTTO GROENER

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin und
Kriminalistik der Universität Erlangen
Direktor: Professor Dr. Dr. E. W e i n i g

Zur Frage der Bildung von Phenyläthylacetyl=
harnstoff aus Luminal.



Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt
von
Otto Groener
aus
Oberglöckau/OS

1958

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen

Dekan: Professor Dr. F. Heim
Referent: Professor Dr. Dr. E. Weinig
Tag der mündlichen Prüfung: 9.8.1958

In Dankbarkeit
meinen Eltern
gewidmet!

Disposition.

	Seite
A. Einleitung	5
B. Hauptteil	
I. Luminal	6
a. Pharmakologisches	7
b. Anwendung	7
c. Aufnahme	8
d. Ausscheidung	9
e. Abbau	11
f. Hydrolyse	12
g. Extraktion	16
h. Isolierung	18
i. Identifizierung	20
II. Eigene Untersuchungen	22
a. Phenyläthylacetylharnstoff	23
b. Versuche mit Reinsubstanzen	27
c. Harnuntersuchungen nach Luminalaufnahme	29
C. Zusammenfassung	35
Literaturverzeichnis	37
Lebenslauf	43

Einleitung.

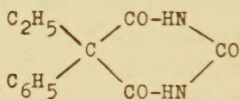
In der Literatur der Vergiftungs- und Selbstmordfälle stößt man immer wieder auf die Barbiturate, in Besonderheit auf das Luminal. Der Nachweis dieser Substanz bereitet aber oft Schwierigkeiten, da sie nur zu einem geringen Teil unverändert und über einen Zeitraum von mehreren Tagen hinaus ausgeschieden wird. Bei Reuter-Lieb-Weyrich ist zu lesen: "Aus dem Organismus wird gewöhnlich nur ein Viertel der zugeführten Substanz unverändert im Harn ausgeschieden. Ein Teil des Luminals wird in Phenyläthylacetylarnstoff, Fp. 147° überführt, der ebenfalls im Harn erscheint", und im Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin schreibt H.Fischer unter dem Stichwort Giftnachweis: "Folgende Substanzen können bei der Ausmittlung von Barbitursäurederivaten gefunden werden. Phenyläthylacetylarnstoff, das Abbauprodukt des Luminals, Fp. 146-147°, Sublimationstemperatur 105-110°, feinste Nadeln und Spieße, zum Teil farbenförmig verwachsen". Auch bei anderen Autoren wird immer wieder der Phenyläthylacetylarnstoff erwähnt, den sie als Ausscheidungsprodukt des Luminals annehmen, im Harn selbst aber nicht fanden.

In unserem Institut wird seit einer Reihe von Jahren an der Verbesserung der Nachweismöglichkeiten, insbesondere bei Barbituraten, gearbeitet. Besonderes Interesse wurde hierbei den Abbauprodukten der einzelnen Barbitursäurederivate zuteil. Im Rahmen dieser Untersuchungen erschien es notwendig, die Frage des Auftretens von Phenyläthylacetylarnstoff nach Luminalaufnahme zu überprüfen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, Phenyläthylacetylarnstoff und andere mögliche Ringspaltprodukte des Luminals zu erzeugen und Methoden für ihren sicheren Nachweis in sehr kleinen Mengen auszuarbeiten. In weiteren Versuchen wurden die in vitro erhaltenen Reaktionen auf Harnextrakte bei Luminalaufnahme angewandt.

Luminal.

Im Jahre 1863 gelang A.v.Bayer die Synthese des Malonylharnstoffes, der Barbitursäure. 1903 berichteten E.Fischer und J.v.Mering über die Einführung eines Derivates der Barbitursäure, des Veronals, in die Therapie und 1912 folgte das Luminal (Impens). Heute gehören die zahlreichen Abkömmlinge der Barbitursäure zum festen Bestand des Arzneischatzes.

Das Luminal, die 5-phenyl-5-äthyl-Barbitursäure ($C_{12}H_{12}N_2O_3$),



ist in der Literatur unter den Bezeichnungen Gardenal, Phenobarbiton, Phenobarbital, Phenemal und Hysteps zu finden. Es sind (Müller, Reuter-Lieb-Weyrich) schwach bitter schmeckende, glänzende Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 174° C. In kaltem Wasser wenig, in warmem leichter und in organischen Solventen gut löslich (in 40 Teilen siedendem Wasser, in 10 Teilen Alkohol, in 15 Teilen Äther). Unter normalem Druck ist es bei Temperaturen von $140-150^{\circ}$ mittels Stufenrohr unter Bildung scharf winkliger, prismatischer Kristalle, im Vakuum (H.Kaiser) bis zu Temperaturen von 110° , sublimierbar.

Kofler und Fischer fanden, daß das Luminal in fünf Modifikationen, die wahrscheinlich alle im monoklinen System kristallisieren und sich durch die Mikroschmelzpunkte (155° , 157° , 160° , 167° , 174°), Brechungsindizes und zum Teil auch durch die äußere Form unterscheiden, auftritt. Huang konnte zwei weitere Modifikationen, von denen eine den Schmelzpunkt 177° hat, nachweisen.

Für die Gerichtsmedizin ist das Luminal insofern von großer Bedeutung, als von allen Vergiftungsfällen 40 % den Schlafmitteln zuzuschreiben sind. Hiervon entfallen 90 % auf die Barbiturate, mit einem Anteil des Luminals von 29 % (Leschke, Henrych, Balasaz, Marri).

Pharmakologisches.

Unter den Barbitursäurederivaten nimmt Luminal als Hypnoticum und Sedativum eine Sonderstellung ein. Seine Wirkung beruht auf

1. Dämpfung der vegetativen Zentren des Hirnstammes,
2. Dämpfung der Großhirnrinde, besonders der motorischen Zentren,
3. einer peripher-spasmolytischen Funktion.

Durch Einführung der Phenylgruppe an Stelle einer Äthylgruppe des Veronal wurde nicht nur eine verstärkte Wirkung, sondern auch ein rascheres Ansprechen der erwähnten Zentren erzielt.

Anwendung.

Hieraus ergibt sich die klinische Anwendung des Luminals bei Epilepsie, Eklampsie, Hyperemesis gravidarum, Paralysis agitans, Chorea, Migräne, hartnäckiger Schlaflosigkeit, spastischen Zuständen der Gefäße und glatten Muskulatur, Vasoneurosen, Hypertonien, Angina pectoris, Asthma bronchiale, Morbus Basedow, Erregungszuständen.

Die Dosis medicinalis beträgt 0,1-0,2 g, als größte Einzelgabe 0,4 g, als größte Tagesgabe 0,8 g. Wegen der kumulierenden Wirkung soll bei Dauergebrauch nicht mehr als 0,2 g/die verabreicht werden. Bei organischen Herzerkrankungen und schwerer Tuberkulose nicht mehr als 0,05-0,1 g.

Die Dosis toxica liegt bei 0,3-0,4 g, die Dosis letalis durchschnittlich bei 4-5 g.

Als Nebenwirkungen bei langdauerndem Luminalgebrauch werden rauschartige Zustände, Schwindel, Diplopie, Somnolenz und Kopfschmerzen, seltener Stomatitis, Angina, Pharyngitis und Durchfälle, sehr selten auch ein Ikterus beobachtet. Auch zu einer Abnahme der psychischen Leistungsfähigkeit, zu Sprachstörungen und Aufregungszuständen kann es kommen. Eine Luminalsucht ist relativ selten.

Bei der akuten Vergiftung steht die Depression des Atemzentrums mit Arreflexie und Erschlaffung der Muskulatur im Vordergrund. Es kommt zu einer Senkung des Atemvolumens mit Cyanose, Blut=

druckabfall und Hypothermie, aber auch epileptiforme Anfälle und starke Gelenk- und Muskelschmerzen von rheumatischem Charakter können auftreten. Für die subakute und subchronische Luminalvergiftung ist das Auftreten von Exanthemen mit Fieber charakteristisch. Es kommt zu einem makulopapulösem Ausschlag, der in eine Dermatitis exfoliativa übergehen kann, zu einer Vergrößerung der tastbaren Lymphdrüsen, zu einer Albuminurie und Glykosurie. Charakteristische pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Befunde treten bei Luminalvergiftung nicht auf.

Aufnahme.

Die Resorptionsgeschwindigkeit hat eine große forensische Bedeutung. Von ihr hängt der Schluß auf den Zeitpunkt der Aufnahme und auf die Menge des eingenommenen Giftes ab. W. Paulus und H.J. Mallach versuchten das Problem auf folgende Weise zu klären. Sie verabreichten Versuchspersonen 0,3 g Luminal peroral in Wasser und nahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aufnahme mit 4 Liter körperwarmem Wasser Magenspülungen vor. Das Ergebnis zeigt nachfolgende Tabelle. Aus ihr geht her-

Spülbeginn nach Barbiturat= aufnahme	Durch Magenspülung wieder= gewonnenes Barbiturat	
Min.	mg	
10	72,3	vor, daß eine schnelle Resorption
20	50,6	stattfindet und daß ein luminal=
40	34,5	nachweis aus dem Mageninhalt auf
50	8,5	Schwierigkeiten stößt, wenn eine
60	1,8	längere Zeit seit der Aufnahme ver=
75	1,5	strichen ist.
90	1,0	Nach der Resorption wandert ein
105	Spuren	Teil des Barbiturates in die Kör=
120	Spuren	pergewebe, worauf der anfangs stei=
		le Abfall der Blutkonzentration be=
		ruht, während der spätere flache
		Abfall der Blutkonzentration dem
		Abbau zuzuschreiben ist.

Ausscheidung.

Über die Ausscheidung des Luminals im Harn findet man in der Literatur sich stark widersprechende Angaben. Impens berichtet, daß die Ausscheidung in unverändertem Zustand durch die Nieren erfolgt, ein nicht unbeträchtlicher Teil aber höchstwahrscheinlich im Körper zerstört werde. Er konnte Luminal nach der für Veronal üblichen Methode aus dem Harn des Menschen isolieren. Auch Feigl fand unverändertes Luminal wieder, und zwar in unwahrscheinlich großen Mengen, während Nolte hingegen zu dem Schluß kommt, daß Luminal weder in Leichenteilen noch im Harn nachgewiesen werden kann, da es ihm in vielen Versuchen, bei denen 0,3-0,6 g Luminal dauernd verabreicht wurden, niemals gelang, es im Harn wiederzufinden. Auch Wetzelaar und Nicolai kamen zu demselben negativen Ergebnis. Sie konnten nach Gaben von 2 bzw. 3 g Luminal keine Spur davon im Harn nachweisen und waren deshalb der Ansicht, daß im Körper ein völliger Abbau des Luminals stattfindet. J. Halberkann und F. Reiche fanden, daß Luminal unverändert mit dem Harn ausgeschieden wird, weisen aber in ihrer Arbeit darauf hin, daß es, falls man zur Reinigung Tierkohle verwendet, von dieser zum großen Teil adsorbiert werde. Das Maß der Ausscheidung zeigen sie an fünf Patienten, geben aber nicht die Art der Isolierung des Luminals an.

Tage	Luminal Dosis	Gesamtmenge	Ausscheidung	
			an Tagen	in Prozent
1. 3	0,6 g	1,8 g	8	11,2
2. 3	0,6 g	1,8 g	8	11,2
3. 3	0,6 g	1,8 g	8	15,8
4. 3	3.0,2 g	1,8 g	11	21,5
5. 3	0,3 g	0,9 g	4	24,5

In den ersten drei Fällen war die Ausscheidung am fünften Tag nach Absetzen des Luminals noch nicht abgeschlossen, bei 4.) war sie nach dem elften Tag fast völlig beendet. Wie individuell verschieden die Ausscheidungsmenge unveränderten Luminals sein kann, zeigt der fünfte Patient, der in vier Tagen fast 25 % eliminierte. Die sich nach Aussetzen des Luminals noch über Tage hinstreckende Ausscheidung steht mit der klinisch beobachteten

kumulierenden Wirkung in Einklang.

Leider geben die Autoren nicht die ausgeschiedene Harnmenge an. H.Kaiser berichtet nämlich, daß die Ausscheidung mit vermehrter Harnausscheidung unverhältnismäßig ansteigt. Er erhielt bei gleichmäßiger Einnahme aus 800 ccm Tagesharn 0,013 g und aus 2000 ccm Tagesmenge Harn 0,24 g Luminal. Dies zeigt, wie sehr man bei Vergiftungsfällen mit Barbituraten auf eine gesteigerte Diurese Wert legen sollte, zumal noch nach Barbiturataufnahme eine starke Harnverminderung zu beobachten ist. W.Koenig und H.Kluge kamen in Bezug auf die Ausscheidung des Luminals zu unterschiedlichen Ergebnissen. In einigen Fällen gelang der Nachweis, in anderen nicht. Diese auseinandergehenden Befunde führen sie auf das stark vermehrte Auftreten von Hippursäure nach Luminalaufnahme und auf die Entstehung von Phenyläthylacetylharnstoff zurück. Um das Luminal von diesen beiden Körpern zu trennen, entwickelten sie eine Extraktionsmethode, die später zu besprechen sein wird. Durch Selbstversuche mit 0,3 g, 0,6 g bzw. 0,8 g Luminal stellten sie eine Ausscheidung fest, die sich aber nach Verlauf von drei Tagen insgesamt nur auf etwa 2 % belief; andererseits fanden sie aber noch nach zehn Tagen Spuren von Luminal im Harn. Ein Auffinden und einen Nachweis des Phenyläthylacetylharnstoffes erwähnen sie nicht. H.Kaiser, der die Reinigung mit Tierkohle und die dadurch auftretenden Verluste infolge Adsorption von Luminal mit Hilfe der Mikrosublimationsmethode umgeht, kommt zu den gleichen Ausscheidungsergebnissen wie Halberkann und Reiche und zieht auch eine Ausscheidungszeit von etwa 10 Tagen in Betracht. Bei Versuchen mit Harn, dem pro 100 ccm 0,1 g Luminal zugesetzt wurde, konnte er aus diesem 0,095 g Luminal isolieren, eine fast 100 %ige Ausbeute. Falls also unverändertes Luminal im Harn ausgeschieden wird, ist es auch erfaßbar. Den Phenyläthylacetylharnstoff als Abbauprodukt bzw. Ausscheidungsprodukt des Luminals zu erfassen und nachzuweisen, war auch ihm nicht möglich. Ebenso erwähnen W.Lang und H.Stephan den Phenyläthylacetylharnstoff als ein im Harn leicht faßbares Abbau- und Ausscheidungsprodukt des Luminals, geben aber keine näheren Angaben. In einem Übersichtsreferat zum Barbituratproblem gibt Raventos eine 50 %ige Ausscheidung von unverändertem Luminal an, was wohl zu hoch gegrif-

fen ist, während Staub von einer durchschnittlich 20 %igen Ausscheidung berichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß 15 bis 20 Prozent Luminal unverändert im Harn erscheinen, und daß sich die Ausscheidung über etwa 10 Tage erstreckt. Sie hängt von der Applikationsart, Gewöhnung, der Gesamtstoffwechselleistung und der Nierenfunktion, d.h. von der ausgeschiedenen Harnmenge ab.

Der Phenyläthylacetylharnstoff, von vielen Autoren als Abbau- und Ausscheidungsprodukt des Luminals erwähnt, konnte bisher im Harn noch nicht erfaßt und nachgewiesen werden, sodaß seine Entstehung intra vitam zweifelhaft erscheint, wenn man auch nicht mit Sicherheit verneinen kann, daß im Organismus Hydrolyseprodukte der Barbitursäuren entstehen können, die in vivo sehr schnell total abgebaut werden.

Abbau.

In einem Referat über das metabolische Schicksal von Barbituraten während der Körperpassage berichtet Raventos, daß Luminal zu 50 % unverändert mit dem Harn ausgeschieden wird. Für den Rest kämen folgende chemische Reaktionen in Frage, die beim Abbau eine Rolle spielen.

1. Oxydation der Radikale in 5-Stellung, die zur Bildung von Keto-, Hydroxy- und Carboxybarbitursäuren führt.

Diese Oxydation der Radikale in 5-Stellung ist der wesentlichste Abbauvorgang. Hier wäre die 1954 von Butler beschriebene 5-äthyl-5-(p-hydroxyphenyl)-Barbitursäure einzureihen, die er im Harn von mit Luminal behandelten Hunden fand. 1955 fand auch A.S.Curry bei akuter Luminalvergiftung papierchromatographisch (Butanol/Ammoniak-Laufmittelgemisch) neben Luminal eine Substanz mit dem Rf-Wert 0,17, die sich später als das oben erwähnte Abbauprodukt erwies, und Algeri und Mc Bay konnten bei einer Luminalvergiftung diese Substanz ebenfalls nachweisen. Auch W.Mohrschulz fand nach Behandlung mit 20 %iger Luminalnatriumlösung i.m. papierchromatographisch (Laufmittelgemisch 45 Vol.% Isopropylalkohol:45 Vol.% Chloroform:10 Vol.% 25%ige Ammoniaklösung) ein Produkt mit dem Rf-Wert 0,02 bis 0,04.

2. Verlust des N-Radikals.

Von diesem Vorgang wird das Luminal selbst nicht betroffen, aber bemerkenswert ist, daß eine andere Barbitursäure, das N-methyl-Luminal (Prominal) infolge der Entmethylierung als Luminal ausgeschieden wird. Butler und Butler et. al. wiesen im Harn von mit Prominal behandelten Hunden, den sie während einer Ausscheidungsdauer von 7 Tagen untersuchten, weniger als 1 % der verabreichten Barbitursäure, aber 20 % Luminal, bezogen auf die Höhe der verabreichten Dosis, nach.

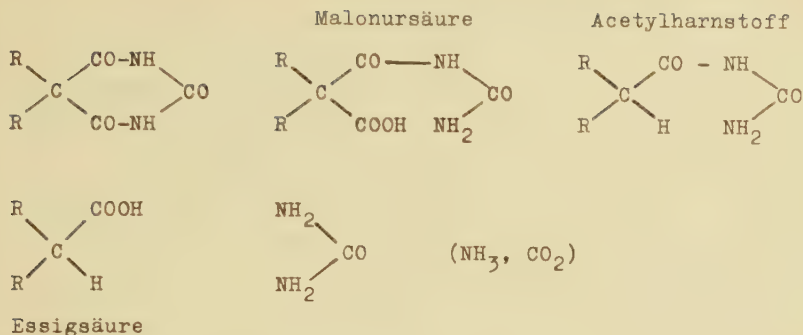
3. Spaltung des Barbitursäurerings.

Da man nur einen geringen Teil der zugeführten Barbitursäure im Harn wiederfindet, nahmen viele Autoren an, daß hierfür die hydrolytische Spaltung des Barbitursäurerings unter Bildung von Acetylharnstoff und Acetamidderivaten verantwortlich sei. Da man aber auch diese Produkte im Harn nicht nachweisen konnte, folgerten sie weiter, daß ein vollständiger Abbau bis zur Kohlensäure, Ammoniak und Wasser vor sich gehe.

Inzwischen ist eine Ringspaltung intra vitam von Block u. Ebigt mit Hilfe radioaktiv-präparierter Substanzen nachgewiesen worden, und zwar als CO_2 in der Ausscheidungsluft, aber nur ca. 1 % der Gesamtmenge injizierter Radioaktivität.

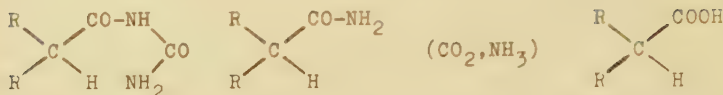
Hydrolyse.

Da im Harn keine Produkte gefunden wurden, aus denen man Schlüsse auf den Abbau, insbesondere den durch Ringspaltung, ziehen konnte, erhob sich die Frage, welchen Weg dieser Abbau im Körper einschlagen könnte. Es war bekannt, daß Luminal in wäßriger Lösung, besonders in Form seiner Alakalisalze, der Hydrolyse unterliegt (Steenhauer), die zu den entsprechend substituierten Essigsäureureiden führt. Die Aufspaltung des Pyrimidinrings bleibt aber nicht auf der Stufe des Ureids stehen, vielmehr kommt es durch fortschreitende Hydrolyse zur Bildung von substituierten Essigsäure und Harnstoff, der durch Wasseranlagerung seinerseits in Ammoniak und Kohlensäure zerfällt (Schlemmer u. Törber).



Nielsen und Aspelund u. Skoglund kommen zu der gleichen Anschauung. Die Letzteren zeigen aber auch am Beispiel der Diallylbarbitursäure die Entstehung von Säureamiden. Die erste Hydrolyse (zum Ureid) tritt leicht ein, während die zweite Hydrolyse (Spaltung zur Essigsäure) selbst bei tagelangem Kochen der Barbitursäure oft nicht nennenswert ist (Bailey, Schwz. Pat. 119642, DRP 459903, Engl. Pat. 264804). H. Ruhkopf untersuchte das Verhalten der Barbitursäuren bei Erhitzen unter erhöhtem Druck und fand, daß die Barbitursäuren bei Drucken bis zu 5 atü auch in rein wäßriger Lösung fast vollständig hydrolysieren, und es entstehen zu etwa gleichen Teilen Säureureid und Säureamid. Mit sinkendem Druck sinkt die Ausbeute an Amid, mit steigendem steigt sie an und ab etwa 10 atü ist es das einzige Hydrolyseprodukt neben Ammoniak und Kohlensäure. Mittels Puffersubstanzen läßt sich dieser Prozeß nach beiden Richtungen hin beeinflussen insofern, als die Salze starker Säuren die Amidbildung bei Drucken bis zu 5 atü weitgehend zurückdrängen, die Salze schwacher Säuren dagegen bei sonst gleichen Bedingungen die Entstehung des Amids begünstigen. Steigert man den Druck über 5 atü, dann verringert sich auch bei Anwesenheit von Salzen starker Säuren die Ausbeute an Ureid, und ab etwa 10 atü ist wieder das Amid das einzige Hydrolyseprodukt. Die Bildung von Amid zeigt an, daß die zweite Hydrolyse nicht in einer Spaltung am Carbonyl der Essigsäure, sondern in einer Aufspaltung des Harnstoffrestes selbst besteht. Freier Harnstoff wurde nie gefaßt.

Das obige Schema wäre also zu ergänzen :



Aspelund u. Skoglund erhielten aus Lösungen der Natriumsalze mehrerer Barbitursäuren durch

1. Kochen der Barbiturate mit äquivalenter Alkalimenge,
 2. Stehenlassen bei Zimmertemperatur mit äquivalenter Alkalimenge,
 3. Stehenlassen bei Zimmertemperatur bei Alkaliüberschuß
- die zugehörigen Malonursäuren, Acetureide, Malonsäuren und Essigsäuren; in einem Falle auch das Acetamid.

F.Fretwurst, dessen Ansätze pro 1 Mol. Luminal 1 Mol. NaOH bzw. 2 oder 3 Mol. NaOH enthielten und in verschlossenem Kolben bei 37° im Brutschrank standen, konnte nach verschiedenen Zeiten die in nachstehender Tabelle verzeichneten Hydrolyseprodukte des Luminals isolieren.

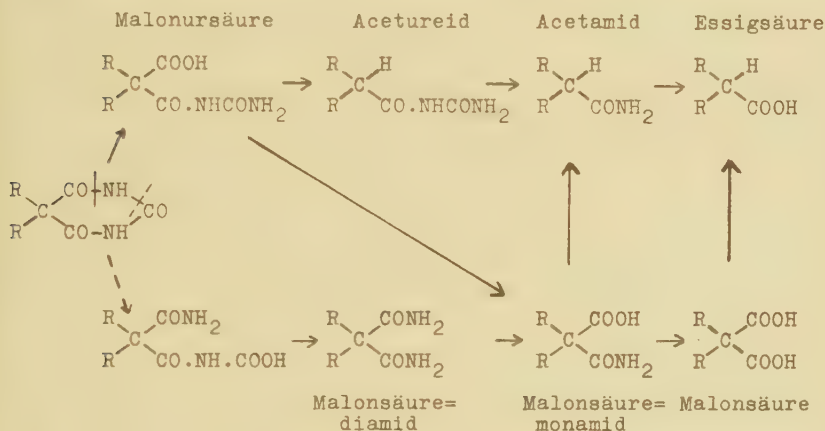
Hydrolyse= dauer in Monaten	% unver= ändert	% Malo= nursr.	% Acet= ureid	% Malonsr- diamid	% Malon= saure	% Essig= saure	% Acet= amid	% Gesamt
8	21,0	-	76,8	1,8	-	-	-	99,6
11 1/2	1,2	-	89,2	1,8	-	4,2	-	96,2
11 1/2	-	-	-	2,6	73,4	20,4	-	96,4
2 NaOH	-	-	-	0,4	80,0	14,0	-	94,4
11 1/2	-	-	-	0,8	89,9	8,3	-	99,0
3 NaOH	-	-	-	0,8	89,9	8,3	-	99,0
45	-	-	-	0,8	89,9	8,3	-	99,0
2 NaOH	-	-	-	0,8	89,9	8,3	-	99,0
Fp.	174°		147°	120°	182°	40°	86°	

Je größer der Alkaliüberschuß, desto schneller ist also nicht nur die Hydrolyse, sondern er bedingt auch eine Verschiebung vom Ureid zur Malonsäure.

Die Spaltung ist so vorstellbar, daß der Barbituratring zwischen C₂ und N₃ (N₁) oder (und) zwischen N₃ (N₁) und C₄ hydrolytisch gesprengt wird. Das Auftreten des Acetureids einerseits und des Malonsaurediamids andererseits beweist, daß die Ringspaltung so=

wohl in der einen als auch in der anderen Richtung erfolgen kann. Unklar an obig aufgeführter Versuchsreihe ist, warum nach 11 1/2 Monaten (2 NaOH) 20,4 % Essigsäure, die ja ein weiterhydrolysiertes als die Malonsäure ist, und 73,4 % Malonsäure, nach 45 Monaten (2 NaOH) aber nur 8,3 % Essigsäure und 89,9 % Malonsäure aufgefunden wurden.

Das Schema der Ringspaltung wäre nun zu vervollständigen :



Die Beständigkeit von Luminalnatriumlösung untersuchte Nielsen. Zur Bestimmung maß er den Betrag der entwickelten Kohlensäure und trennte das entstandene Ureid aus alkalischer Lösung mit Chloroform vom Luminal. Der Verlust betrug 1 % bei 1° C in 60 Tagen bzw. bei 20° C in 20 Tagen. W.J.O'Reilly u. S.Wright fanden eine stärkere Zersetzung und glaubten, es auf ihre genauere Bestimmungsmethode zurückführen zu können. Sie lösten den getrockneten Rückstand in Pyridin und titrierten mit Natriummethoxyd gegen Phenolphthalein als Indikator. In Vorversuchen hatten sie festgestellt, daß bei dieser Methode das Luminal als Säure von vorhandenem Phenyläthylacetylharnstoff nicht beeinflusst wird. 5, 10 und 20 %ige Luminalnatriumlösung untersuchten sie nach Aufbewahrung in verschlossenem Kolben bei verschiedenen Temperaturen. Nachstehende Tabelle zeigt Ihre Ergebnisse.

Prozentualer Verlust von Luminalnatriumlösung nach Aufbewahrung.

Lösung in %		5			10			20		
Temperatur		5°C	15°	30°	5°	15°	30°	5°	15°	30°
Zeit	2	o	o	o	o	o	o	o	o	o
in	3	o	o	1,6	o	o	2,6×	o	o,2	1,5
Tagen	4	o	o	3,0	o	o	5,2	o	o,4	3,0
	5	o	o	4,8×	o	o,2	5,8	o,2	o,6	4,4×
	10	o	o	9,0	1,4	1,8	8,8	1,1	1,5	8,2
	15	o	o,4	11,0	3,0	3,3	11,8	2,0	2,4	10,0+
	25	o	2,0	14,0+	5,9	6,4	17,8	3,6	4,1	13,0
	30	o	2,7	--	7,4	7,9	--	4,3	4,9+	--
	35	o	3,4	--	8,4	9,4+	--	5,1+	6,0	--

× Luminalnatrium fiel aus,

+ Kristalle, hauptsächlich Phenyläthylacetylharnstoff, traten auf.

Wenn man die angegebenen Werte miteinander vergleicht, fällt auf, daß 10 %ige Luminalnatriumlösung am stärksten der Zersetzung unterliegt.

Extraktion.

In Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Milz läßt sich Luminal nachweisen; geeigneter hierfür ist der Inhalt des Verdauungstraktes, falls noch nicht zu viel Zeit nach der Einnahme verstrichen ist, das Blut und der Liquor cerebrospinalis. Das geeignetste Untersuchungsmaterial liefert aber wohl der Harn. Fäulnisveränderungen des Barbiturates in ihm, wie sie noch Panzer annahm, werden heute kaum mehr anerkannt. Aufgrund neuerer Untersuchungen kommt Gg. Schmidt vielmehr zu dem Ergebnis, daß der Nachweis von Luminal aus abgestandenen Harnen infolge des Abbaues normaler Harnbestandteile besser gelingt.

Als Extraktionsmittel kommen Chloroform, das verhältnismäßig reine, aber geringe Substanzmengen liefert, Äther und Äthylacetat in Betracht. Mit ihnen werden aus

- | | |
|--------------------------------|---|
| 1) saurer Lösung | Barbiturate, Ureide, organische Säuren, Harnfarbstoffe, |
| 2) alkalischer Lösung | freie Basen, Spuren von Barbiturat, |
| 3) bicarbonat-alkalischer Lsg. | Barbiturate, vor allem ihre Oxydationsprodukte, Harnstoffspuren |

extrahiert. Es ist zweckmäßig, hierzu einen Perforationsapparat nach Greiner u. Friedrichs zu verwenden, da man dann mit geringen Mengen des Lösungsmittels auskommt. Will man eine Reinigung der Extrakte vornehmen, so eignet sich dafür Kohle mit Aluminiumoxyd am besten (R.Fischer), da nach Nachwaschen mit Äther und Ätheralkohol kaum ein Verlust an Barbiturat durch Adsorption eintritt.

Störend können sich Hippursäure, die nach Luminalaufnahme gelegentlich stark vermehrt ist, Benzoesäure und Harnstoff auswirken, die bei der Extraktion mit erfaßt werden. Um das Barbiturat von diesen Körpern zu trennen, schlagen W.Koenig u. H.Kluge folgende Extraktionsmethode vor : Der Harn wird mit Weinsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherauszüge werden nach dem Waschen mit Wasser durch ein trockenes Filter blankfiltriert und auf dem Wasserbad zur Sirupdicke eingengt. Nach Aufnahme des Rückstandes mit heißem Wasser und anschließender Abkühlung auf Zimmertemperatur wird die Lösung mit verdünnter Natronlauge alkalisch gemacht und mit Äther ausgeschüttelt (Ätherlösung A). Die abgetrennte wäßrige Lösung wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit festem Natriumbicarbonat versetzt, bis sie gegen Lackmuspapier alkalisch reagiert; danach wird sie wieder mit Äther ausgeschüttelt (Ätherlösung B). Die abgetrennte wäßrige Lösung wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt (Ätherlösung C). Es sind zu erwarten in (A) Phenyläthylacetylarnstoff, in (B) Luminal, in (C) Hippursäure und Benzoesäure.

F.Fretwurst entwickelte ein Verfahren zur Trennung des Barbiturates von seinen Hydrolyseprodukten, das auf einer Isolierung des Barbiturates von neutralen Substanzen einerseits und stärkeren Säuren anderseits beruht : Wenn man - etwa zur gleichzeitigen Trennung von ätherlöslichen Basen - die zu extrahierende

Lösung von vornherein stark ansäuert und neutrale und saure Verbindungen zusammen extrahiert, so lassen sich aus der Ätherlösung durch mehrfaches Ausschütteln mit frischer Natriumhydrogencarbonat-Lösung zunächst die stärkeren Säuren (Malonursäure, Malonsäure, Essigsäure) und dann mit 10 %iger Ammoniaklösung oder 5 %iger Natronlauge die Barbitursäuren extrahieren, während die neutralen Substanzen (Malonsäurediamid, Acetureid, Acetamid) im Äther zurückbleiben und durch einfaches Abdestillieren des Lösungsmittels gewonnen werden können. Barbitursäuren und die anderen Säuren werden nach Ansäuern der Ammoniak- bzw. NaHCO_3 -Extrakte wieder mit Äther ausgeschüttelt.

Isolierung.

Zur einwandfreien Identifizierung eines Stoffes ist dessen Vorliegen in größtmöglicher Reinheit erforderlich. Um dies bei den Barbituraten zu erreichen, wendet man folgende Verfahren an :

1.) Fällungsmaßnahmen.

Sie beruhen auf einer Fällung des Barbiturates mit Schwermetallsalzen wie z.B. Quecksilbersulfat (Fleury u. Guinneeault) oder Kupfersulfat-Pyridin (Zwicker). Bei Bauer-Moll findet man eine Zusammenstellung der Fällungsmethoden zum Nachweis der Barbiturate.

2.) Sublimation.

Hierbei werden feste Körper durch **Erwärmen in Dampf** verwandelt, der sich bei Abkühlung, d.h. wenn die Temperatur zu niedrig ist, um den Körper im dampfförmigen Zustand zu halten, in Form von charakteristischen Kristallen niederschlägt. Nach Kofler sind etwa $\frac{4}{5}$ aller organischen Substanzen bei geeigneten Sublimationsbedingungen in kristalliner Form zu erhalten. Entscheidend ist der temperaturabhängige Dampfdruck. Da die einzelnen Substanzen größtenteils eine unterschiedliche Verdampfungstemperatur haben, gelingt es, sie bei ihrer Sublimationstemperatur aus einem Gemisch zu isolieren. L.Kofler und R.Kempf stellten Tabellen über Sublimationszeit, Druck und Temperatur zusammen.

a) Mikrosublimation.

Im Prinzip ist es eine Sublimation zwischen zwei Objektträgern. Geräte und Methodik wurden von L.Kofler, H.Behrens, A.Helwig entwickelt und beschrieben.

b) Mikrosublimation im Vakuum.

Der Dampfdruck ist vom Gasdruck im umgebenden Raum unabhängig; die Verdampfungsgeschwindigkeit jedoch ist bei niedrigem Gasdruck der Umgebung größer, da sich die Dämpfe nicht sättigen. Bei gesättigtem Druck stellt sich aber ein Gleichgewicht zwischen Dampfphase und fester Phase ein und die Sublimation kommt zum stehen. In der Vermeidung einer Dampfsättigung und somit Erhöhung der Sublimationsgeschwindigkeit liegt der Vorteil der Sublimation im Vakuum. Von Gg.Schmidt, H.Kaiser und W.Haas u. R.Eder kommen Arbeiten zu diesem Thema.

c) Fraktionierte Sublimation im Vakuum.

Durch die Ausnutzung des Umstandes, daß die Sublimationstemperatur der einzelnen Stoffe verschieden ist, wird bei dieser Methode Sublimation und Trennung in einem Arbeitsgang erreicht (Gg.Schmidt). M.Behrens gab eine Apparatur an, die auf dem Prinzip eines Wärmegradients beruht. Wir benutzten eine von Gg.Schmidt entwickelte Modifikation dieses Gerätes :

Über einem Führungsrohr, das zur Aufnahme des Sublimationsrohres dient, liegt eine Glashülse, die durch spiralenförmige Umwicklung mit Heizdraht so erwärmt wird, daß ein kontinuierlicher Temperaturabfall von einem zum anderen Ende entsteht. In diesem Wärmegrradienten verteilen sich die sublimierenden Substanzen je nach ihrer druckabhängigen Verdampfungstemperatur in Zonen. Das Sublimationsrohr kleideten wir mit einer eingezogenen Hostaphanfolie der Fa. Kalle, Wiesbaden, mantelförmig aus. Die zu untersuchenden Substanzen führten wir - in Filtrierpapier gewickelt - etwa 5 cm in das Sublimationsrohr ein, schmolzen dahinter zu und schlossen das offene Ende des Rohres an eine Vakuumpumpe an und bei laufender Vakuumpumpe wurde etwa 30 Min. sublimiert. Die einzelnen Fraktionen, die sich in unterschiedlichen Abständen auf der Folie niedergeschlagen hatten, konnten wir mitsamt dieser aus dem Rohr ziehen und weiterhin untersuchen.

Identifizierung.

1.) Colorimetrie.

Eine gebräuchliche Art der Identifizierung ist die Probe nach Zwikker, bei der Barbiturate mit Cobaltsalzen in wasserfreiem Milieu und alkalischer Reaktion blaue Komplexe bilden. Sie wurde von H.Oettel zu einem halb-quantitativen Verfahren ausgearbeitet. Auch die von J.Büchi u. Perlia angegebene Kupfer-Pyridinreaktion ist von hoher Barbitursäurespezifität. Diesen Reaktionen ist gemeinsam, daß sie nur einen Gruppennachweis für Barbiturate liefern.

2.) Schmelzpunktbestimmung.

Zur Ausführung dieser Bestimmung muß die zu untersuchende Substanz in praktisch reiner Form vorliegen, da schon geringe Verunreinigungen eine Schmelzpunktdepression bewirken. Zur Sicherung ist daher die Bestimmung eines Mischschmelzpunktes erforderlich. Bei einer Verunreinigung findet man beim Zusetzen von reiner Substanz ein Ansteigen des Schmelzpunktintervalles; tritt aber eine Erniedrigung des Mischschmelzpunktes ein, so handelt es sich nicht um die erwartete Substanz. Von H.Goldbach und R.Opfer-Schaum kommen Arbeiten zu diesem Thema und M.Brandstätter und L.Kofler stellten viele Stoffe tabellarisch nach ihren Schmelzpunkten geordnet zusammen.

3.) Molekulargewichtsbestimmung.

4.) Kristalloptik.

5.) Komplexbildung.

Mit Schwermetallsalzen bilden die Barbiturate Komplexe von charakteristischer Form. Die Arbeiten von Gg.Schmidt, F.Lüdy-Tennger, W.Lang u. H.Stephan, H.Kaiser u. W.Lang zeigen, daß mit dieser Methode ein ziemlich sicherer Nachweis der einzelnen Barbiturate erreicht werden kann.

6.) Spektrofotometrie.

Durch Absorptionsmessungen im

a) UV-Licht (W.F.Elvidge, L.R.Goldbaum)

b) ultrarot-Licht (C.J.Umberger u. C.Adams)

erhält man von den Barbituraten ein charakteristisches Absorptionsspektrum. L.R.Goldbaum fand im UV-Licht für die Barbiturate ein Absorptionsmaximum in saurem Milieu bei 220 m μ und in alkalischem Milieu bei 255 m μ .

7.) Papierchromatographie.

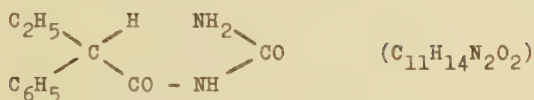
Die Papierchromatographie ist eine verbreitete Methode und viele Arbeiten, u.a. die von R.Deininger, W.Mohrschulz und E.J.Algeri u. J.T.Walker befassen sich mit dem papierchromatographischen Nachweis von Barbitursäurederivaten.

Eigene Untersuchungen.

Ziel der Arbeit : Nachweis von Phenyläthylacetylharnstoff
im Harn nach Luminalaufnahme.

Das Ziel der Untersuchungen war, die Möglichkeiten des Nachweises von Phenyläthylacetylharnstoff im Harn nach Luminalaufnahme zu prüfen und, wenn möglich, zu klären. Hierzu wurde in Vorversuchen zunächst einmal festgestellt, welche Substanzen im Harn in Betracht kommen, die sich auf den Nachweis von Phenyläthylacetylharnstoff und auch auf Luminal, sowie andere mögliche Abbauprodukte desselben störend auswirken könnten, zumal der Harn in der Regel größere Mengen organischer Säuren enthält, die, je nach Art der angewendeten Isolierungsmaßnahmen, den Nachweis der gesuchten Substanz mehr oder weniger stören. Hierbei kommen insbesondere Hippursäure, Benzoesäure und Harnstoff in Betracht. Weiterhin wurde der Phenyläthylacetylharnstoff in Reinsubstanz hergestellt und sein Verhalten und seine Nachweismöglichkeiten geprüft. Unter Berücksichtigung der ermittelten Ergebnisse wurde abschließend (nach Aufnahme bis zu 0,5 g Luminal) der Harn auf etwa vorhandenen Phenyläthylacetylharnstoff und andere Hydrolyseprodukte des Luminals wie Phenyläthylacetamid und Phenyläthyl-essigsäure, die durch Aufspaltung des Barbitursäureringes entstehen könnten, untersucht.

Phenyläthylacetylharnstoff.

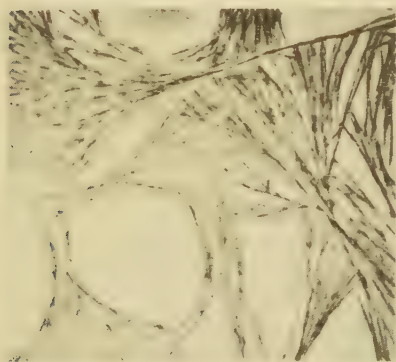


Herstellung. (Fa. Bayer & Co.)

α-phenyl-n-Buttersäure (Phenyläthyllessigsäure) wurde durch Behandeln mit Phosphortrichlorid in das entsprechende Chlorid überführt. 182,5 Teile des so erhaltenen Chlorids wurden mit 120 Teilen Harnstoff im Wasserbad bis zur Beendigung der Salzsaureentwicklung verschmolzen. Nach Aufarbeiten der Reaktionsmasse erhielten wir den Phenyläthylacetylharnstoff.

Der so erhaltene Phenyläthylacetylharnstoff hatte den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt von 147°-148° C. Er ist in Wasser schwer, in Alkohol, Chloroform und Äther gut löslich.

Mikrosublimation nach Kofler.



Bei 115° C bilden sich größere Tropfen, aus denen ab 128° lange, garbenartig wachsende Nadeln kristallisieren. Dazwischen bleiben Tropfen erhalten. Beim Auswechseln des Objektträgers schlagen sich auch kleine, an den Enden spitze, dunkler gefärbte Nadeln nieder, die sich netzartig aneinanderlagern. Bei 147° schmilzt die Grundsubstanz.

Vakuumsublimation. (s.S. 19, 2 c)

Von 10-14 cm vereinzelte bis gekreuzte, drusenartige Nadeln, die sich auch zu dichten, drusenartigen Kugeln vereinen. Die sphärischen Drusen sind teils radiär, teils zentrisch gewachsen. Übergang der sphärischen Drusen in zarte, radiär verzweig-

te Stengeldrusen mit feinster Verästelung in der Peripherie. Dazwischen kleine Nadelbüschel mit starker Lichtabsorption und größere, dichtere, stachelige Drusen der absorbierenden Nadeln.

Eisen-Komplex.

Nach dem Erwärmen bilden sich dunkelbraune Nadelpolster, aus denen lange, sich verzweigende Nadeln wachsen.

Zwicker - negativ.

Chromatographischer Nachweis.

Der Phenyläthylacetylharnstoff wurde in Alkohol gelöst und auf das Chromatogramm aufgetragen. Nach 12-stündiger Laufzeit in einem Butanol/5 n NH_3 -Laufmittelgemisch ergab er im UV-Licht beim R_f -Wert 0,85 eine Absorption. Mit

- 1) Quecksilber-I-nitrat zeigte er keine Reaktion,
- 2) Munier-Macheboeuf's-Sprühreagenz bildeten sich schwache, orange-farbene Flecken.

Um die Phenyläthylacetylharnstoffmenge, die mittels UV-Absorption noch erfaßt werden konnte, festzustellen, wurden 1,7 mg Phenyläthylacetylharnstoff in 1 ccm Alkohol gelöst und in Konzentrationen von 5,1 , 8,5 , 17 , 34 , 51 , 102 und 204 Gamma aufgetragen. Am Startpunkt ergaben noch 8,5 Gamma eine Absorption, nach 10-stündiger Laufzeit konnten beim R_f -Wert 0,85 17 Gamma einwandfrei nachgewiesen werden.

Hydrolyse von Luminal.

10 ccm 10 %iger Luminallösung wurden in einem verschlossenen Bombenrohr in einem Paraffinbad 2 Tage auf etwa 110°-120° C erhitzt, wobei sich 3 Produkte bildeten :

- 1) Weißer, feinflockiger Niederschlag, der abfiltriert und getrocknet wurde.

Schmp.: 82°-84° C

Mikrosublimation: Bei 75° Tropfenbildung, jedoch keine Kristallisation. Erst beim Abkühlen bilden sich garbenförmig gelagerte Nadeln, die am Rande des Sublimats peitschenförmig auslaufen.

Vakuumsublimation: Von 17-21 cm flächige Tropfen, die beim Abkühlen muschelartig erstarren. Dazwischen kleine, sich kreuzende Nadeln.

- 2) Fest verbackenes weißes Produkt, das sich dicht über der Lösung ringförmig an das Rohr angelagert hat. Der Rohrinhalt riecht nach Ammoniak.

Schmp.: 146°-148° C

Mikrosublimation: Ab 118° bilden sich Tropfen, aus denen bei 128° lange, sich kreuzende und garbenartig wachsende Nadeln kristallisieren. Dazwischen bleiben Tropfen erhalten. Auf einem ausgewechselten Objektträger bilden sich kleine, spitze, an den Enden dunkler gefärbte Nadeln, die sich zu einem Netz aneinanderlagern.

Vakuumsublimation: Von 9-14 cm einzelne oder gekreuzte kleine Nadeln, die sich auch zu drusenartigen Kugeln vereinigen. Die sphärischen Drusen sind radiär und zentrisch gewachsen. Dazwischen kleine Nadelbüschel und dichte, stachelige Drusen.

Von 20-24 cm ein sternförmig verzweigter, hauchiger Niederschlag.

Das Sublimat von 9-14 cm hatte einen Schmelzpunkt von 147°; es zeigte die gleichen Mikro- und Vakuumsublimationsbilder

wie der Phenyläthylacetylharnstoff, ergab mit diesem keine Mischschmelzpunkterniedrigung und auch die Eisen-Komplexe waren identisch.

- 3) 20 cm über der Lösung, an der Wand des Rohres, eine dünne, flache Nadel.

Schmp.: 88° - 107° C

Mikrosublimation: Die Substanz verflüchtigte, ohne Tropfen oder Kristalle zu bilden.

10 ccm 10 %iger Luminalnatrium-Lösung wurden in verschlossenem Bombenrohr im Paraffinbad 2 Tage auf 110° C erhitzt. Nach dem Abkühlen bildete sich in der zunächst klaren Lösung ein weißer Niederschlag, der abfiltriert und getrocknet wurde. Das Filtrat zeigte eine starke Doppelbrechung, raue Oberfläche, starke Lichtreflexion und bestand aus stabchenförmigen Kristallen.

Schmp.: 82° - 85° C

Zwicker: negativ

Mikrosublimation: Bei 75° bilden sich große Tropfen, es kommt aber zu keiner Kristallbildung. Erst beim Abkühlen bilden sich garbenartig angeordnete Nadeln, die am Rande des Sublimats peitschenförmig auslaufen.

Vakuumsublimation: Von 20-22 cm flache, breite, in der Längsrichtung gespaltene und zerfaserte Nadeln, die sich teilweise kreuzen.

Bei einer anderen Sublimation bilden sich großflächige Tropfen, die beim Abkühlen muschelförmig erstarren.

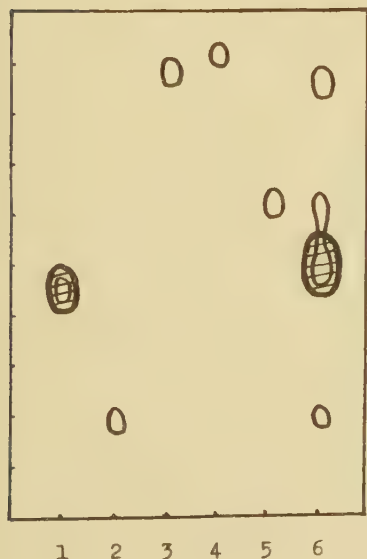
Da die Substanz 1) des ersten Versuches und die Substanz des zweiten Versuches aufgrund ihrer Schmelzpunkte als das Phenyläthylacetamid angesehen werden konnten, wurde dieser zum Vergleich hergestellt :

Eine Mischung von 82 g Phenyläthylelessigsäure und 120 g Thionylchlorid wurden im Rückflußkühler 2 Stunden erhitzt, wo=

nach die Salzsäure entfernt zu sein schien. Das überschüssige Thionylchlorid wurde unter vermindertem Druck abdestilliert und das erhaltene rohe Säurechlorid wurde langsam und unter Umrühren in 400 ccm konz. Ammoniumhydroxyd, das im Eisbad gekühlt wurde, eingeleitet. Die Temperatur bei der Reaktion wurde immer unter 15° gehalten. Nachdem das ganze Säurechlorid zugegeben war, wurde das Amid von der kalten Lösung abfiltriert und getrocknet. Es wurde in Äther gelöst, filtriert und nach Abdestillieren des Lösungsmittels zeigte es einen Schmelzpunkt von 83° - 85° C.

Das so gewonnene Amid ergab mit den oben erwähnten Substanzen keine Schmelzpunkterniedrigung und zeigte die gleichen Bilder und das gleiche Verhalten bei der Mikro- und Vakuumsublimation wie diese Substanzen.

Versuche mit Reinsubstanzen.

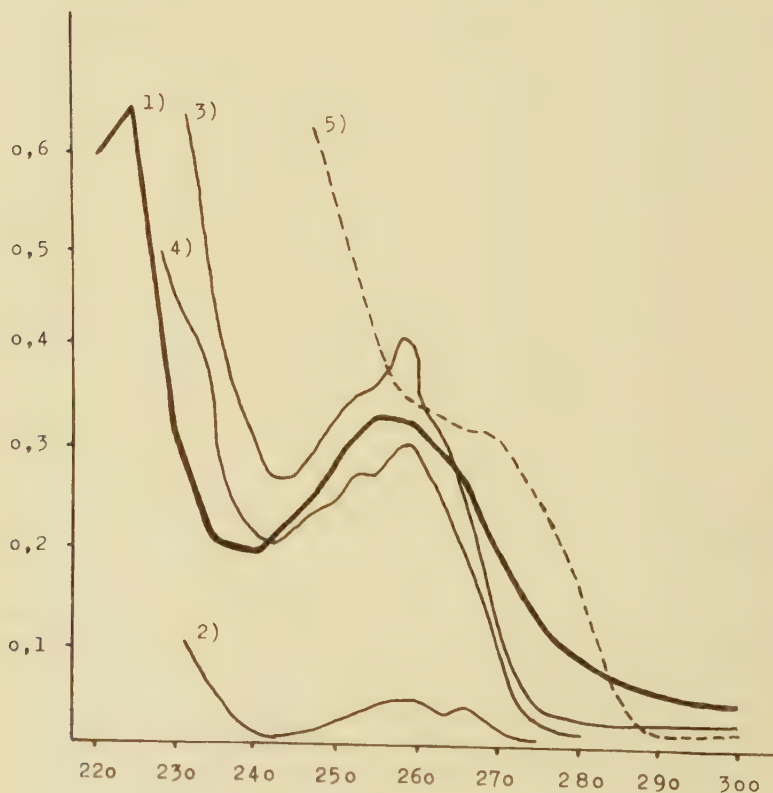


- 1 Luminal,
- 2 Hippursäure,
- 3 Phenyläthylacetylarnstoff,
- 4 Phenyläthylacetamid,
- 5 Phenyläthylelessigsäure,
- 6 Gemisch von 1, 2, 3, 4, 5

wurden in Chloroform gelöst und auf das Chromatogramm aufgetragen. Nebenstehende Abbildung zeigt das Chromatogramm nach einer 12-stündigen Laufzeit in einem Butanol/5 n Ammoniak Laufmittelgemisch. Alle fünf Substanzen zeigten eine Absorption im UV-Licht, beim Bad in Quecksilber-I-ni=trat Lösung ergab nur das Luminal eine grauschwarze Fleckenbildung.

1) Luminal	1,1 mg	in	100 ccm	0,5 n NaOH
2) Phenyläthylacetylharnstoff	1,1 mg	in	20 ccm	0,5 n NaOH
3) Phenyläthylacetamid	3,2 mg	in	10 ccm	0,5 n NaOH
4) Phenyläthylelessigsäure	2,6 mg	in	10 ccm	0,5 n NaOH
5) Benzoessäure	1,5 mg	in	20 ccm	0,5 n NaOH

gelöst, ergaben im UV-Licht im Wellenbereich von 220 $m\mu$ bis 300 $m\mu$ folgende Absorptionskurven :



	Rf	UV	Hg	Mu	Fp.
Luminal	0,4 - 0,6	a	grs		174°
Phenyläthylacetylharnstoff	0,8 - 0,9	a	-	or	147-148°
Phenyläthylacetamid	0,88 - 0,96	a	-	or	83-85°
Phenyläthylelessigsäure	0,37 - 0,65	a	-	-	44-45°
Hippursäure	0,17 - 0,4	a	-		187°
Benzoessäure	0,3 - 0,4	a	-		122°

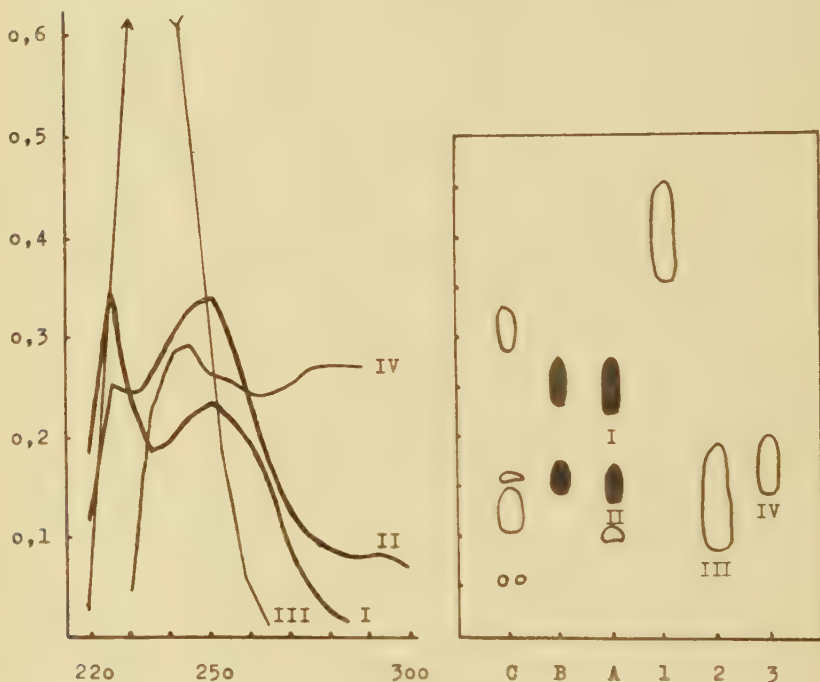
Erklärung der Abkürzungen :

- Rf = Rf-Streuwerte, die bei einer 12-stündigen Laufzeit in einem Butanol/5 n Ammoniak Laufmittelgemisch gefunden wurden,
- UV = Verhalten im UV-Licht,
- a = Absorption,
- Hg = Reaktion mit Quecksilber-I-nitrat,
- grs = grauschwarze Fleckenbildung,
- Mu = Reaktion mit Munier-Macheboeuf' Sprühreagenz,
- or = orange-farbene Fleckenbildung,
- Fp. = Schmelzpunkte der von uns verwendeten und gewonnenen Substanzen in Grad C.

Harnuntersuchungen nach Luminalaufnahme.

Nach Aufnahme von 0,2 g Luminal wurden 200 ccm des ersten und 200 ccm des zweiten Ausscheidungstages gemeinsam nach der von Koenig u. Kluge (s.S. 17) angegebenen Methode extrahiert, wobei in A Phenyläthylacetylharnstoff, in B Luminal, in C Hippursäure und Benzoessäure zu erwarten waren. Die Rückstände A und B waren weiß-hauchig, C war braun und schmierig. Sie wurden in Chloroform-Alkohol gelöst, aufs Chromatogramm aufgetragen, und liefen 12 Stunden im Butanol/5 n Ammoniak Laufmittelgemisch. Daneben liefen Phenyläthylacetylharnstoff 1), Hippursäure 2) und Benzoessäure 3). Ein Chromatogramm kam ins Quecksilber-I-nitrat Bad, von einem zweiten wurden die den entstan-

denen Flecken entsprechenden Stellen und die Absorptionsstellen von 2) und 3) mit 0,5 n NaOH eluiert und spektrofotometrisch untersucht.



Die eluierten Substanzen I und II ergaben typische Barbituratabsorptionskurven mit einem Kurvenmaximum bei 250 $m\mu$ im UV-Licht.

Die Reste der Rückstände A, B und C wurden mit chloroformnasser Watte aufgenommen und gemeinsam im Vakuum sublimiert. Es trennten sich zwei Fraktionen.

1) Dicht vom Rückstand bis 10 cm teils bräunliche, teils farblose Tropfen. Am Anfang noch sphärolithische Kristalle.

Fe-Komplex : In Kälte Braunfärbung, nach Erhitzen dunkelblaue

und dunkelbraune Tropfen (Hippursäure und andere, nicht bestimmbare Substanzen).

Mikrosublimation : Ab 115° bilden sich Tropfen, die bald zusammenfließen, aber bis 240° keine Kristallbildung. Beim wiederholten Sublimieren dieser Tropfen bildet sich eine lange, sehr dünne Nadel, die bei 190° schmilzt (Hippursäure).

2) Zwischen 15 und 20 cm kleinere Kristalle von verunreinigter Benzoesäure.

Nach Aufnahme von 0,5 g Luminal besteht am nächsten Tag eine leichte Benommenheit und subjektiv und objektiv wird eine Verminderung der Harnausscheidung beobachtet.

1. Ausscheidungstag.

Die Harnportion des ersten Tages (etwa 350 ccm) wird mit Äther (Perforationsapparat nach Greiner-Friedrichs) erst weinsauer 1), dann bicarbonat-alkalisch 2) und darauf NaOH-alkalisch extrahiert 3).

Vakuumsublimation :

1) 5-7 cm Schmierig-hauchiger Niederschlag.

Mikrosublimation: Keine Tropfen und keine Kristallbildung.

17-23 cm Kleine, vieleckige Kristalle, die sich auch zu kugeligen Gebilden zusammenballen.

Mikrosublimation: Ab 60° , ohne vorausgehende Tropfenbildung, erst kleine gekreuzte Nadeln, dann aus dem Zentrum wachsende breite Nadeln und Platten, die an der Seite gekerbt sind. (In dieser Art und Form sublimiert die Benzoesäure). Bei 100° schmilzt die Grundsubstanz.

2) 4-7 cm Brauner, schmierig-hauchiger Niederschlag.

Mikrosublimation: Keine Tropfen, kein Sublimat.

6-15 cm Unregelmäßige, dicke Prismen. Dazwischen kugelige Anhäufungen aus spitzen Nadeln.

Mikrosublimation: Wie 1) 17-23 cm.

3) Wie 2).

Die Fraktion 17-23 cm von 1) wurde auf ein Chromatogramm aufgetragen und lief 12 Stunden in einem Butanol/5 n Ammoniak Gemisch. Daneben liefen Phenyläthylacetylarnstoff, Phenyläthylacetamid und Phenyläthylelessigsäure. Im UV-Licht zeigte sich beim R_f -Wert 0,45-0,6 eine Absorption, die auf gleicher Höhe wie die Absorption der daneben gelaufenen Phenyläthylelessigsäure lag. Als nach etwa 2 Wochen die Stelle zur weiteren spektrofotometrischen Untersuchung mit NaOH eluiert werden sollte, zeigte es sich, daß die Substanz ebenso wie die Phenyläthylelessigsäure verflüchtigt war und keine Absorption mehr ergab. Bei einem jetzt wiederholten Aufbringen der oben erwähnten Fraktion auf ein Chromatogramm konnte eine entsprechende Absorption nicht mehr gefunden werden. Nur Benzoesäure und Hippursäure waren nachzuweisen.

2. Ausscheidungstag.

400 ccm Harn des zweiten Tages wurden nach den Angaben von Fretwurst (s.S. 17) extrahiert :

Der stark weinsaure Harn wurde zunächst mit Äther extrahiert. Dieser Ätherextrakt dann zuerst mehrmals mit frischer NaHCO_3 -Lösung, darauf mit 5 %iger Natronlauge ausgeschüttelt. Der verbliebene Äther wurde eingedampft (I), die NaHCO_3 -Lösung (II) und die NaOH-Lösung (III) wurden wieder angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt, der ebenfalls eingedampft wurde. Es waren zu erwarten in

I Malonsäurediamid, Acetureid, Acetamid,

II Malonursäure, Malonsäure, Phenyläthylelessigsäure, Hippursäure, Benzoesäure,

III Luminal.

Die so erhaltenen Rückstände aus I, II und III wurden in Chloroform-Alkohol gelöst, aufs Chromatogramm aufgetragen

und liefen 12 Std. in einem Butanol/5 n Ammoniak-Gemisch.

Die verbliebenen Rückstände von I, II und III nahmen wir mit chloroformnasser Watte zusammen auf und sublimierten im Vakuum.

0-3 cm Brauner, schmieriger Niederschlag.

Mikrosublimation: Keine Tropfenbildung, keine Kristallbildung.

7-9 cm Vereinzelte bis kugelig zusammengeballte kleine Nadeln.

Mikrosublimation: Ab 56° , ohne vorherige Tropfenbildung, kleine, spitze, sich kreuzende Nadeln und Bänder, die am Rand eingekerbt sind. Die Grundsubstanz schmilzt bei 96° (Benzoesäure).

9-13 cm Dicke, unregelmäßige Prismen und balkenförmige Kristalle.

Mikrosublimation: Art und Form wie die Fraktion von 7-9 cm, die Grundsubstanz schmilzt aber bei 118° .

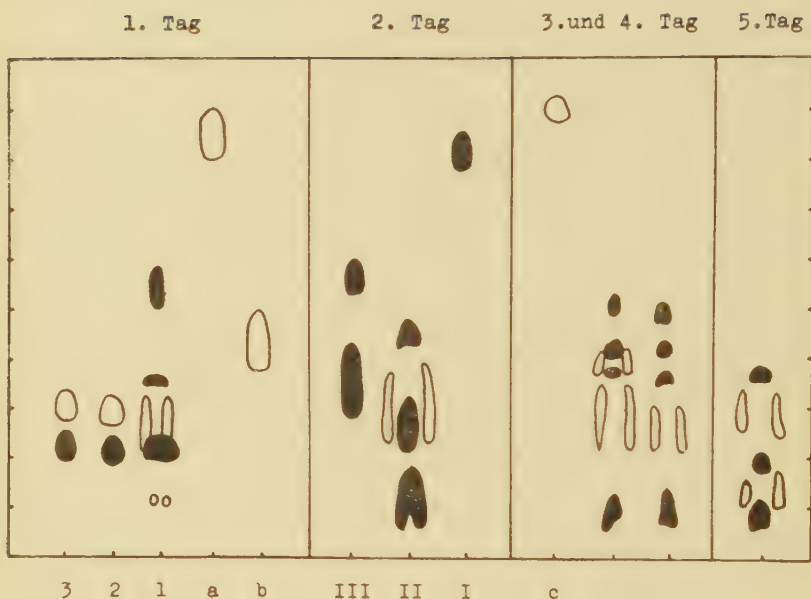
-17 cm Braune, schmierige Flecken und Tropfen.

Mikrosublimation: Ab 50° kleintropfiger, flächiger Niederschlag, der wieder verschwindet. Grundsubstanz schmilzt zwischen 80° - 90° .

3., 4. und 5. Ausscheidungstag.

Je 400 ccm Harn werden weinsauer extrahiert, und die erhaltenen Rückstände laufen auf dem Chromatogramm 12 Std. im Butanol/5 n Ammoniak-Gemisch.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Chromatogramme der einzelnen Tage nach dem Behandeln im Quecksilber-I-nitrat Bad. Die Absorptionsstellen im UV-Licht sind umrandet, die Quecksilber-I-nitrat Flecken schwarz eingezeichnet.



- 1 weinsauer extrahiert,
- 2 bicarbonat-alkalisch extrahiert,
- 3 NaOH-alkalisch extrahiert,
- a Phenyläthylacetylharnstoff,
- b Phenyläthylelessigsäure,
- c Phenyläthylacetamid,
- I weinsaurer Ätherextrakt, der erst mit II = NaHCO_3 -Lösung und anschließend mit III = NaOH-Lösung ausgeschüttelt wurde,
- II Ätherextrakt der angesäuerten NaHCO_3 -Lösung,
- III Ätherextrakt der angesäuerten NaOH-Lösung.

Zusammenfassung.

Der Phenyläthylacetylharnstoff wurde nach dem Patentverfahren der Fa. Bayer & Co. hergestellt; außerdem konnte er durch Hydrolyse einer 10 %igen Luminallösung, die in verschlossenem Bombenrohr 2 Tage auf 110° C erhitzt wurde, gewonnen werden. Als ein zweites Hydrolyseprodukt trat dabei das Phenyläthylacetamid auf. Nachdem der Phenyläthylacetylharnstoff als Reinform vorlag, wurde sein Verhalten untersucht. Bei der Mikro- und Vakuumsublimation bildete er charakteristische Kristalle, auch die Eisen-Komplex-Bildung war typisch. Auf dem Chromatogramm ergab er im Butanol/5 n Ammoniak-Laufmittelgemisch stabile Rf-Werte, die mit Hilfe seiner UV-Licht Absorption ermittelt werden konnten, wobei die Erfassungsgrenze bei etwa 17 Gamma liegt. Eine Farbreaktion mit Quecksilber-I-nitrat oder Cobaltsalzen tritt nicht ein.

Die Versuche, ihn als Abbauprodukt des Luminals, das bis zu 0,5 g als Einzeldosis eingenommen wurde, im Harn zu erfassen, verliefen negativ. Er wurde in den Harnextrakten weder bei der Sublimation, noch papierchromatographisch gefunden. Auch ein anderes Abbauprodukt des Luminals, das durch hydrolytische Aufspaltung des Barbitursäureringes entstehen könnte, konnte nicht sicher nachgewiesen werden, es wurden aber bei einigen Versuchen im UV-Licht Absorptionen gefunden, die aufgrund ihres Rf-Wertes an die Phenyläthylelessigsäure denken lassen. Neben Lumininal wurden papierchromatographisch beim Rf-Wert 0,3 (Butanol/Ammoniak-Gemisch) Substanzen gefunden, die mit Quecksilber-I-nitrat Flecken bildeten und im UV-Licht bei alkalischem Milieu typische Barbituratkurven mit dem Absorptionsmaximum bei 255 m ergaben. Auch beim Rf-Wert 0,08-0,2 zeigten sich im UV-Licht Absorptionen, die auf Quecksilber-I-nitrat ansprachen, und bei denen es sich wohl um die 5-äthyl-5-(p-hydroxyphenyl)-Barbitursäure handeln kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Phenyläthylacetylharnstoff, der als ein Abbauprodukt des Luminals angenommen wird, bisher im Harn nicht nachgewiesen werden konnte, was aber nicht ausschließt, daß ein Abbau des Luminals im Körper durch

hydrolytische Sprengung des Barbitursäureringes stattfinden kann, wobei die Hydrolyseprodukte schnell total abgebaut werden.

Herrn Professor Dr. Dr. E.Weinig möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und Herrn Dozent Dr. Gg.Schmidt für seine Unterstützung und seine Anregungen danken. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für eine Sachbeihilfe, die bei einem Teil der Untersuchungen Verwendung fand, verbindlichst gedankt.

Literaturverzeichnis.

- Algeri, E.J. and A.J. Mc Bay The identification of pentobarbital
by papierchromatography in a medicolegal death.
N. England J. M. 248, 423, 1953
- Algeri, E.J. and J.T. Walker Papierchromatographischer Barbituratnachweis. Am.J.Path. 22, 37, 1952
- Aspelund u. Skoglund Die Beständigkeit der Natriumsalze einiger Schlafmittel der Barbituratreihe in Lösung. Acta Acad. Aboensis math. physic. 10, 10, 1937
- Balasz, J. Vergiftungsstatistik aus Ungarn. Slg. Verg.-Fälle 393
- Balasz, J. Schlafmittelvergiftungen. Slg. Verg.-Fälle 5, C 26, 1934
- Bauer, K.H. - Moll, H. Die organische Analyse. Akad. Verlagsges., Leipzig 1954
- Bayer & Co., Fa. Verfahren zur Darstellung von Derivaten α -arylierter Säuren. DRP Kl. 120 Nr. 249241 v. 1/5.1910 (13/7.1912)
- Behrens, M. u. Fischer, A. Zerlegung von Stoffgemischen und Identifizierung von chemischen Substanzen durch Verdampfung und Kondensierung in einem Wärmegradienten. Naturwissensch. 41, 1, 1954
- Behrens, H. u. P.D.C. Kley Organische mikrochemische Analyse. 2. Aufl., Verlag L. Voss, Leipzig 1922
- Block, W. u. Ebigt, I. Zum Stoffwechsel radioaktiv markierter Barbiturate und Thiobarbiturate. Arzneimittelforschung 9, 572, 1957
- Büchi, J. und Perlia Beiträge zum Nachweis therapeutisch

- wichtiger Barbiturate. Schweiz.
Apoth.Ztg. 29, 290, 1954
- Brandstätter, M. Zur Identifizierung von Barbitursäure-
rederivaten. Mikrochem.Mikrochim.
Acta 38, 68, 1951
- Butler, T.C. Metabolic oxydation of phenobarbi-
tal to p-hydroxyphenobarbital.
Science, 120, 494, 1954
- Butler, T.C. Quantitative studies of the metabo-
lic fate of mephobarbital.
J.Pharmacol.exp.Ther. 106, 235, 1952
- Butler, T.C. The metabolic hydroxylation of phe-
nobarbital. J.Pharm.exp.Ther. 116,
326, 1956
- Bailey, A.E. Zersetzung von Barbitursäurelösung
durch Hitze. Pharmac.Journ.Amer.
chem.Soc. 58, 1352, 1936
- Butler, T.C. u. Mahaffee, C. Phenobarbital: studies of eliminati-
on, accumulation, tolerance and dose=
u. W.J.Waddel. age schedules. J.Pharm.exp.Ther.
111, 425-435, 1954
- Curry, A.S. A note on the paper chromatographic
separation of phenobarbitone metabo-
lites. J.Pharm.Pharmacol. 7, 604, 1955
- Deininger, R. Papierchromatographischer Nachweis
der Barbitursäuren. Arzneimittel=
forschung 5, 472, 1955
- Elvidge, W.F. Absorption spektrophotometry in phar-
maceutical analysis. Quart.J.Pharm.
Pharmacol. 13, 219, 1940
- Fischer, E. u. J.v.Mering Über eine neue Klasse von Schlaf-
mitteln. Ther.d.Gegenwart. 3, 1903
- Fischer, H. Schlafmittel in: Handwörterbuch der
gerichtl. Med. und naturwissen=

- schaftl. Kriminalistik von Neureiter-Pietrusky-Schütt. 1940
- Fischer, R. Zum mikrochem. Nachweis der gebr. Schlafmittel. Mikrochemie 34, 247, 1949
- Fleury, P. u. E. Guinebeault L'émulsion de la phenylethylmalonyluree. C.R.Soc.Biol. 93, 1508, 1925
- Fretwurst, F. Der Abbau von Natriumbarbituraten in wässriger Lsg. bei 37° C. Arzneimittelforschung 8, 1958
- Goldbach, H.J.. Schnellverfahren z. toxicol. Nachw. v. Barb. Klin.Wschr. 27, 706, 1949
- Goldbaum, L.R. Eine Ultraviolett-spektrophotometrische Methode f. d. Bestimmung v. Barb. J.Pharmacol.exp.Ther. 94, 68, 1948
- Gonzales, A.Th. u. M.Vance, Legal Medicine Pharmacology and Toxicology. 2.Aufl. 1954, Appleton-Century-Crofts Inc. New York
- M.Helper, C.J.Umberger
- Greiner u. Friedrichs (Perforationsapparat) Die chemische Fabrik 1, 91, 1928 u. 2, 90, 1929
- Haas, W. u. R.Eder Vakuumsublimation synthetischer Arzneistoffe. Sonderdruck E.Heim & Co. Wien 1930
- Halberkann, J. u. F.Reiche Über die Ausscheidung einiger verw. Barbitursäureverbindungen mit dem Urin. Münch.med.Wschr. 74, 1450, 1927
- Helwig, A. Das Mikroskop in der Toxikologie. Verl. V.v.Zabern, Mainz 1865
- Hendrych, F. Veramonvergiftungen. Slg.Verg.-Fälle 5, C 77, 1934
- Huang, T.Y. The identification of derivatives of barbituric acid by x-Ray analysis. Acta Pharm.Intern. Vol.II 43, 95, 1951

- Huang, T.Y. u. B. Jerslev On the use of x-ray powder pattern for the identification of barbiturates in forensic chemistry. Acta Pharmacol. Toxicol. 7, 227, 1951
- Impens, E. Pharmakologisches über Luminal. D.med.Wschr. 38, 946, 1912
- Kaiser, H. Beiträge zum toxikol. Nachw. wichtiger Barbitursäurederivate unter bes. Berücksichtigung d. Mikrosublimation im Vakuum. Verl.d.Südd.Apothekerztg. Stuttgart 1932
- Kaiser, H. u. W.Lang Schlafmittelverg. u. ihr Nachw. über die komplexen Schwermetalljodide. Pharm.Zentralhalle 91, 281, 1952
- Kempf, R. Über ein neues Verfahren der Mikrosublimation. Ztschr.analyt.Chem. S.284 1923
- Kempf, R. Sublimation in: Houben, Die Methoden der org. Chemie. Bd.I, 3.Aufl. 1925 663-707, Thieme Verlag Leipzig
- Kofler, A. u. R.Fischer Über die Polymorphie d. Luminals. Arch. Pharm.Ber.Pharm.Ges. 27, 483, 1953
- Kofler, L. Mikromethoden zur Kennzeichnung org. Stoffe u. Stoffgemische. In: Hoppe-Seyler-Thierfelder. Hdb.d.physiol.u. path.-chem.Analyse. 10.Aufl.I Bd., 1.T. Springer Verlag Heidelberg 1953.
- Kofler, L. u. A.Kofler Thermo-Mikromethoden zur Kennzeichnung org. Stoffe u. Stoffgemische. Verl. Chemie GMBH Weinheim 1954
- Kofler, L. u. W.Dernbach Über Vakuumsublimation unter d. Mikroskop. Mikrochemie 9, 345-349, 1931
- König, W. u. H.Kluge Über den Nachw. v. Luminal im Harn. Chemikerztg. 1930, S. 451

- Lang, W. u. H. Stephan Mikrochem. Identifizierung von Schlafmitteln in d. toxicol. Praxis. Südd. Apotheker-Ztg. 38, 739, 1950
- Leschke, E. Erk. u. Behandl. d. wichtigsten Verg. Münch. med. Wschr. 2, 1600, 1931
- Lüdy-Tenger, F. Mikrochem. Identitätsreaktionen f. die pharm. Praxis. Pharm. Act. Helv. 9, 385, 1944
- Marri, R. Über 214 Verg.-Fälle mit Barbituraten. Slg. Verg.-Fälle 3, C 51, 1939
- Mohrschulz, W. Versuche zur papierchromatographischen Identifizierung von Schlafmittelgiften im Urin. Arch. d. Pharm. 289, 508, 1956
- Müller, B. Gerichtl. Medizin Springer Verl. 1953
- Nielsen Dansk. Tidskr. f. Farmaci 7, 1937, (1933)
- Nicolai, H. W. Luminalverg. Kl. Wschr. 2, 1891, 1923
- Nolte, E. Über den Nachweis von Luminal Pharm. Zeitschr. 65, 320, 1920
- Oettel, H. Luminalverg. u. Luminalnachweis Slg. Verg.-Fälle 6, A 483, 43, 1935
- Opfer-Schaum Quant. Barbituratnachw. in d. forens. Praxis. Mikrochemie 39, 263, 1952
- Panzer Vierteljahresschrift für gerichtliche Medizin. 1908, S. 311
- Paulus, W. u. Mallach H. Über die Resorptionsgeschw. von Phenyläthylbarbitursäure. Arch. f. Toxikologie. 15. Bd., Heft 2, 1954, Springer Verl.
- Raventos, J. The distribution in the body and metabolic fate of barbiturate. J. Pharm. Pharmacol. 6, 232, 1954
- O'Reilly u. Wright S. E. The stability of solutions of phenobarb. J. Pharm. Pharmacol. 4, 1954
- Rotondaro, F. A. The separation and determination of phenobarbital in solutions.

- J.of the Assoc.of the official agricultural chemists. 23, 1940
- Reuter-Lieb-Weyrich Gifte und Vergiftungen in der gerichtl. Medizin. Verl. Urban & Schwarzenbach, Berlin-Wien 1938
- Ruhkopf, H. Über die Hydrolyse substituierter Barbitursr. Ber.d.Chem.Ges. 2,938,1940
- Staub, H. Die Ausscheidung d. Barbitursr. bei der Dauerschlafbehandlung der Schizophrenie. Schw.Arch.Neur.Psychiatr. 65,330,1956
- Steenhauer, A.J. Mitt.aus d.pharm.Labor d.Reichsuniv.Leiden. 47.Mitt. Zersetzung v.Medinallsgg. Pharm.Weekblad 1154, 1927
- Schlemmer u. Törber Dtsch.Apothekerztg. 651, 1938
- Schmidt, Gg. Kristalloptische Nachweismethoden in der forens. Toxikologie. Zeiß-Mitteilungen 1, 95, 1957
- Schmidt, Gg. Die toxicol.Harnanalyse z.Nachw.von Barbitursr.und Harnstoffabkömmlingen. Habilitationsschrift, Erlangen 1957
- Schmidt, Gg. Fraktionierte Vakuumsublimation zur Isolierung sehr kleiner Substanzmengen. Vortrag vor d.Chem.Ges.Ortsgruppe Erlangen, 7.2.1957
- Umberger, C.J. u. Adams Identification of malonyl ures derivatives. Anal.Chem. 24,1309,1952
- Umberger, C.J. In Gonzales
- Wetselaar (D.J.K.) Luminalverg. Pharm.Weekbl. 59,521,1922
- Zwikker, H. Het Aantoonen en het Afzonderen von B. bij het tox.Onderzoek. Pharm.Weekblad 68,975,1930
- Zwikker, H. Recherches et isolement des barbitals dans les expertises toxikologiques, J.Pharm.Chim. 19,189,1934

Lebenslauf.

Am 18.3.1926 wurde ich als Sohn des Kriminalobersekretärs Emil Groener und dessen Ehefrau Marta, geb. Veliks, in Oberglogau (Oberschlesien) geboren. Nach der Volksschule besuchte ich das humanistische Gymnasium in Oppeln, wo ich im April 1944 das Abitur ablegte. Anschließend hatte ich mich an der Universität zu Breslau zum Medizinstudium immatrikuliert, wurde aber zur Wehrmacht eingezogen und geriet im April 1945 in russische Gefangenschaft, aus der ich im Juni 1945 nach Westdeutschland entkommen konnte. Bis ich meine Eltern wiederfand, mein Vater war in tschechischer Internierung, meine Mutter aus Schlesien vertrieben, war ich an einer amerikanischen Dienststelle in Bremen beschäftigt. 1949 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Erlangen und legte hier 1955 das Staatsexamen ab. Im Anschluß daran arbeitete ich im Institut für gerichtliche Medizin der Universität Erlangen an meiner Dissertation, war als Praxisvertreter tätig und bin zur Zeit als Pflichtassistent am Marien-Hospital in Erlangen.

